

p185 蛋白及其抗体的研究进展

王琛 刘兢

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027)

摘要 描述了 p185 在信号转导过程中的功能, 讨论了抗 p185 抗体的蛋白质工程及它们在肿瘤治疗中的应用.

关键词 p185^{neu/c-erbB-2}, 信号转导, 预后, 肿瘤治疗

学科分类号 Q939.91

受体酪氨酸激酶 (简称 RTK) 基因的异常行为在癌症的发生和发展中起着非常重要的作用, *P₁₈₅* (又称 *neu*, *c-erbB-2* 或 *HER2*) 基因便是其中的一个. 从 80 年代初至今, 人们对其参与的信号转导机理, 其与癌变的关系和作为预后标记的可能性, 以及将其作为治疗的靶蛋白而引起的针对它的抗体在应用于诊断和治疗方面的发展, 作了许多的研究, 并且正在进行下去.

1 p185 的分子结构

neu 最早是在大鼠的神经母细胞瘤 DNA 转化 NIH/3T3 细胞的实验中发现的. Coussens 等在 1985 年测得人 *neu* 基因的 cDNA 序列, 以后将人的 *neu* 基因称为 *erbB-2* 或 *HER2*. *erbB-2* 基因编码的蛋白 p185 是一个分子质量为 185 ku 的跨膜糖蛋白, 有一个胞外的配体结合区 (有两个富含半胱氨酸区), 一个跨膜区, 一个胞内酪氨酸激酶同源区, 在 C 端有几段保守序列, 环绕在五个酪氨酸磷酸化位点周围, 其结构如图 1 所示.

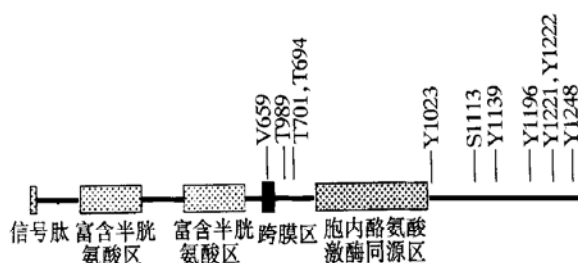


图 1 p185 的分子结构

erbB-2 属于 RTK 家族中的生长因子受体 *erbB* 亚家族, 同属于这亚家族还有 *EGFR* (即 *erbB1*), *erbB3*, *erbB4*, 这些基因编码的蛋白质都享有广泛的同源性, 其中 p185 与 *EGFR* 的同源性在膜外区高达 40%, 膜内区高达 70%^[1].

2 p185 的信号转导机理

p185 被激活后, 形成同二聚体或与 *ErbB* 家族其他成员形成异二聚体的活性形式, 发生自身磷酸化, 并磷酸化其他底物, 引起下游的信号转导, 最终导致细胞的增殖乃至癌变^[2].

2.1 p185 的激活受到多种方式的调控

p185 与其他生长因子受体一样, 受到配体的激活, 经过近 10 年的寻找, Samata 等报道了一个分子质量为 15~17 ku 的生长因子 NAF (*neu* activating factor), 是迄今为止找到的最接近 p185 配体性质的一个蛋白质, 它能特异地和 p185 的胞外区结合, 诱导二聚体的形成, 导致受体的激活和内吞等^[3]. p185 蛋白上某些特定位置上的突变能导致它的异常激活, 最先在大鼠中发现的 *neu* 癌基因与其原癌基因只有一个氨基酸的差别, 即膜内区 664 位的 Val → Glu, 这个氨基酸的置换加强了分子之间的氢键作用, 使其更易形成二聚体从而被激活, 并导致细胞的转型和肿瘤化^[4]. p185 的超表达是它异常激活的另一形式, 在人类的恶性肿瘤中, p185 的激活就是由它在细胞膜表面的过量表达引起的. Samata 等^[3]进行的体外实验表明 p185 浓度增加会使其形成具有酶活性的二聚体形式, 将正常的 *P₁₈₅* 基因转入 NIH/3T3 细胞并在细胞表面超表达时也能引起细胞表型转化, 效果与上述突变的 p185 类似, 这是其他的生长因子如 *EGFR* 所不具备的性质. *erbB* 家族蛋白的转移调控也与 p185 的激活密切相关, 这些蛋白质会以不同的组合形式共同表达于多种组织细胞中, p185 在这些受体的信号传导中起着中心作用, 它可以与表皮生长因子受体 (*EGFR*)、*erbB-3*、*erbB-4* 形成异二聚

体, 在这些受体相应配体, 如表皮生长因子 (EGF), NDF, heregulin, glial growth factor 等的刺激下, p185 也会被激活, 并且能够大大增加这些受体对其配体的亲和性. Hynes^[5,6] 的最新研究表明, erbB 家族受体之间彼此形成二聚体的方式受严格的等级控制, p185 是其余几种受体形成异二聚体的最先选择, 并在它们的侧向信号传递中也起着非常重要的作用, 这也部分说明了为什么 p185 的致癌能力相对较强, 以至单独过表达的 p185 能引起细胞的恶性转化, 而单独过表达 EGFR 不能引起这种转化, 如图 2 所示.

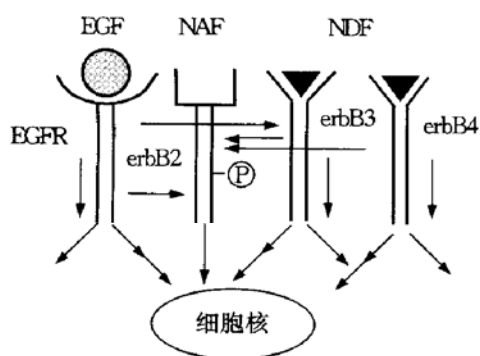


图 2 erbB 家族信号转导中的转移调控

2.2 信号转导

p185 形成同二聚体或与其他受体形成异二聚体后, 导致自身磷酸化, 为含 SH2 区域的胞内蛋白提供了高亲和位点, 由于 p185 有许多二聚体形式的组合, 所以, 它参与的途径也很多, 能与其结合的分子包括许多与 RTK 相关的共同底物, 如 Grb2, Shc, 磷酸酶 C- γ , 磷酸肌醇 3-激酶等. 其中, 通过 Grb2 能与 Ras-MAPK 信号转导途径偶联, 可以激活 fos 和 jun 等转录因子的表达, 进而导致细胞的分裂增殖^[2].

3 p185 的临床诊断与预后意义

p185 在 20% ~ 30% 左右的乳腺癌和卵巢癌病人, 在部分胃癌, 结肠癌, 前列腺癌的肿瘤组织中呈高表达, 报道最多的是乳腺癌与 p185 表达水平的相关性. Ravdin 等^[7] 的一篇综述对若干年来多个实验室的结果, 即免疫组化所测得乳腺癌肿瘤组织细胞膜 p185 表达水平与对乳腺癌病人跟踪随访结果的关系, 作了十分详尽的分析, 表明 p185 的高表达对于乳腺癌病人, 至少其中的淋巴结阳性亚群, 有着重要的预后意义, 预示这类病人的肿瘤浸润性高, 复发的可能性大, 总的存活期短, 可以作

为一个仅次于淋巴结损伤的预后指标. p185 还有一种分泌到血清中的形式, 可能即相当于它的膜外区, Leitzel 等^[8] 报道表明这种分泌形式在浸润性较高的乳腺癌病人中有超表达, 也可作为肿瘤诊断和监测的一个标记. p185 的表达对治疗也有一定的指导作用, 有实验结果表明, p185 的高表达能使病人对化疗不敏感^[2]. 因此, p185 对临床诊断有非常重要的意义.

4 抗 p185 抗体的应用和发展

由于抗体特别是单克隆抗体对抗原识别的特异性, 又由于 p185 在乳腺癌及其他癌症中做为一个肿瘤标记的特殊地位, 抗 p185 的抗体不仅能用于肿瘤组织上 p185 水平的诊断, 而且由于有的抗体能够在体外甚至体内抑制高表达 p185 的肿瘤细胞的生长, 所以它们还可用于特异性针对 p185 的肿瘤治疗; 另外, 抗体在研究 p185 的生物学功能的领域中也发挥独特的作用.

4.1 p185 单抗的生物学活性

自从 Mark Greene 最早发现了抗鼠 p185 的单克隆抗体 7.16.4 对细胞表面 p185 的下调作用, 以及对超表达 p185 的人乳腺癌细胞 SK-BR-3 和移植到小鼠上的超表达 p185 的肿瘤明显的抑制作用, 预示了其在治疗上应用前景^[9], 一些实验室陆续制备了抗人 p185 的单克隆抗体, 并从多个角度对这些抗体的生物学作用进行了研究. 这些抗体与 p185 的膜外区特异性结合, 能起到类似激动剂或拮抗剂的作用, 引起 p185 自磷酸化程度的升高或降低, 对膜上的 p185 有不同程度的下调, 在体外和体内抑制或促进高表达 p185 肿瘤细胞的生长. 值得注意的是, 抗体对细胞生长的影响在体外和体内不完全一致, 例如 p185 单抗 N28 在体外能促进高表达 p185 肿瘤细胞的生长, 而在体内反而抑制高表达 p185 的肿瘤组织的生长^[10], 这种不同的效应可能是由抗体与 p185 结合的位点不同引起的. 抗体在动物体内的作用还受到肿瘤浸润性, 旁分泌等其他生理过程的影响, 所以, 在选择合适的抗体应用于治疗时, 需要慎重考虑.

4.2 p185 单抗的抗体工程改造及其应用

能在体内特异性抑制高表达 p185 的肿瘤发生的单克隆抗体有很好的应用前景, 但由于其鼠源性, 用于治疗还需对其进行抗体工程改造, 降低其在人体内的抗原性. 4D5 是最早得到的抗人 p185 的单克隆抗体, 其工程改造的研究进行得比较深

入。4D5 能特异性地结合 p185, 在短期内起到类似激动剂的作用, 使 p185 的磷酸化水平升高, 并能激活 IP3、IP4 激酶途径, 长期作用能特异性地抑制膜表面高表达 p185 的细胞株 SKBR3 的生长。Cater 等^[11]详细地描述了 4D5 的人化过程, 主要是将 4D5 的 6 个互补决定区 (CDR) 移植入人的 IgG1 内, 由于框架区上有的氨基酸残基参与了抗原的结合或对抗体三维结构的维持有重要作用, 还要根据能量最低原理, 经模拟计算后, 替换人抗体框架区的某些氨基酸残基。其中得到的 hum-Ab4D5-8 保持了对 p185 的高亲和性, 能体外抑制高表达 p185 的细胞株, 以及移植肿瘤的生长, 并能介导 ADCC 反应。最近有报道, 美国 Genentech 公司在 p185 单抗基础上研制的命名为 Herceptin 的新药已经通过 III 期临床, 这种新药和化疗结合使用时, 能显著抑制高表达 p185 的乳腺肿瘤组织的生长, 使之收缩甚至在有些病例中使肿块消失^[12, 13], 而且副作用小, 开辟了一条全新的治疗途径。在人化抗体的基础上, 还可以将抗体的 V_H 和 V_L 通过一个连接子连接起来, 获得单链抗体。将两种特异性不同的单链抗体连接起来可以得到双特异性抗体, 具有双重功能。Rodrigues 等^[14]报道了将人化 anti-p185 和 anti-CD3 的单链抗体相连而得到的双抗体分子, anti-p185 臂提供特异性结合 p185 的能力, anti-CD3 提供特异性结合 CD3⁺ 效应 T 细胞, 能介导 CTL 的杀伤作用, 可以特异性杀死高表达 p185 的肿瘤细胞如 SKBR-3 等, 也有望成为肿瘤治疗药物。

4.3 抗体在研究 p185 机理方面的应用与发展

Hynes 实验室应用抗 p185 内抗体研究 p185 信号转导机理, 他们将抗 p185 的单链抗体和将其定位于内质网腔内 C 端序列 DYKD 的基因连在一起, 转化高表达 p185 的细胞, 表达后的单链抗体定位于内质网腔内, 与在粗面型内质网上新生的 p185 的胞外区结合, 干扰了 p185 从内质网到细胞表面的运输, 使得 p185 在细胞膜上的表达水平降低, 从而引起它功能上的失活, 再利用这种 p185 的表型缺失的细胞, 去研究 p185 在信号转导中的作用。这种方法可以广泛应用于细胞表面或细胞内多种受体和其他蛋白质的功能研究。他们还发现抗 p185 内抗体的表达还可以使超表达 p185 的转化细胞的恶性发生逆转, 所以内抗体也可做为另一条针对肿瘤标记的可能的治疗途径^[15~17]。

机理的研究和技术的发展相辅相成, 互相促

进。综上所述, p185 的信号转导机理研究, 及其做为肿瘤靶蛋白而导致的相应抗体的研究和抗体在诊断、治疗上的应用, 为其他肿瘤相关抗原的研究提供了一个很好的典范, 具有许多借鉴意义。同时, 有关 p185 及其作用机理仍值得进一步深入下去。

参 考 文 献

- 1 Coussens L, Teresa L Y, Liao Y C, *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 1985, **230** (4730): 1132~1139
- 2 Hynes N E, Stern D F. The biology of p185/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **198** (1): 165~184
- 3 Samata A, Levea C M, Dougall W C, *et al.* Ligand and p185^{neu} density govern receptor interactions and tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (5): 1711~1715
- 4 Weiner D B, Liu J, Cohen J A, *et al.* A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature*, 1989, **339**: 230~231
- 5 Porta D G, Beerli R R, Daly J M, *et al.* ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *J EMBO*, 1997, **16** (7): 1647~1655
- 6 Porta D G, Beerli R R, Hynes N E. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of p185 impairs neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (3): 1182~1191
- 7 Ravdin P M, Chamness G C. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular marker-a review. *Gene*, 1995, **159**: 19~27
- 8 Leitzel K, Teramoto Y, Sampson E, *et al.* Elevated soluble c-p185 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 1992, **10**: 1436~1443
- 9 Drebin J A, Link V C, Stern D F, *et al.* Down-Modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, 1985, **41** (3): 695~706
- 10 Stancovski I, Hurwitz E, Leitner O, *et al.* Mechanistic aspects of the opposing effects of monoclonal antibodies to the ERBB2 receptor on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (9): 8691~8695
- 11 Cater P, Presta L, Gorman C M, *et al.* Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (10): 4285~4289
- 12 Baselga J, Norton L, Albanell J, *et al.* Recombinant humanized anti-HER2 antibody, (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer. *Cancer Research*, 1998, **58** (13): 2825~2831
- 13 McNeil C. Herceptin raise its sights beyond advanced breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, **90**: 882~883
- 14 Rodrigues M L, Refaat S M R, Werther W, *et al.* Engineering a humanized bispecific F(ab')₂ fragment for improved binding to T cells. *Int J Cancer*, 1992, Supplement 7: 45~50
- 15 Harwerth I M, Wels W, Marte B M, *et al.* Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J Biol Chem*, 1992, **267** (21): 15160~15167

- 16 Harwerth I M, Wels W, Schlegel J, *et al.* Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit *in vivo* tumor cell growth. *Br J Cancer*, 1993, **68**: 1140~ 1145
- 17 Beerli R R, Wels W, Hynes N E. Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem*, 1994, **269** (39): 23931~ 23936

Advances in Research of p185 Protein and Its Antibodies. WANG Chen, LIU Jing (*School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China*).

Abstract p185^{neu/c-erbB-2} is a receptor tyrosine kinase. It's overexpressed in some adenocarcinomas, such as breast cancer and ovary cancer. It not only plays an important prognostic role, but also acts as a therapeutic target in breast cancer. Its function in signal transduction is described. The protein engineering of antibodies against p185 and their application in cancer therapy is also discussed.

Key words p185, signal transduction, prognostic, cancer therapy

DNA 损伤与细胞周期调控*

于廷曦 朱应葆¹⁾ 童坦君²⁾

(北京医科大学第三临床医学院, 北京 100083)

摘要 DNA 损伤和损伤后修复可引起细胞周期阻滞, 这一事件由三个阶段组成: 损伤的识别, 损伤信号的传递以及细胞周期阻滞。在某些情况, 这种细胞周期阻滞会失效。

关键词 DNA 损伤, 细胞周期阻滞, 信号传导

学科分类号 Q753

DNA 是生命活动中最重要的遗传物质, 保持其分子结构的完整性对于细胞至关重要。然而, DNA 复制时可以由于 DNA 聚合酶引发出偶然的错误, 环境因素 (如电离辐射、紫外线照射及化学诱变物等) 亦可引起 DNA 序列错误, 另外, DNA 分子本身尚可以出现一些自发性损伤, 据统计, 每个细胞的 DNA 在 24 h 内约出现 1 万次损伤^[1]。

DNA 损伤直接影响复制、转录和蛋白质合成, 进而影响细胞遗传、发育、生长和代谢等生命活动。DNA 损伤还是突变的重要原因, 而严重的突变则可造成细胞癌变、死亡。单细胞生物必须修复 DNA 的损伤, 或产生一定程度对损伤的耐受, 才能保证生物个体的生存; 多细胞生物体内单个细胞的死亡虽不影响生物个体的生存, DNA 损伤诱发的细胞凋亡对生物个体也没有太大的影响, 但 DNA 损伤可导致某些遗传病及肿瘤的发生, 因此, DNA 损伤修复系统对多细胞生物同样具有重要意义。

对于生殖细胞及保持增殖能力的细胞 (如干细胞), 由于细胞不断的增殖, 细胞总是处于从 G1、S、G2 和 M 期的连续的细胞周期中。在细胞周期的各阶段, 细胞分别进行着 DNA 复制、蛋白质合

成及细胞分裂等重要的生理活动。每一阶段都是下一阶段的准备期, 真核细胞可以在启动下一个周期前监测与一个细胞周期顺利完成相关的生化事件。这包括各种体内外因素威胁下游事件进行时可逆地将细胞周期阻滞在特定的生理阶段的能力, 而这种特定的生理阶段称为检定点 (checkpoint)。只有前一阶段的生理活动完成后, 才能通过称为检定点的阶段, 进入周期的下一步。一些突发事件引发的细胞反应能影响驱动细胞周期前进的因子, 从而使细胞周期停滞在检定点, 这被称为细胞周期阻滞 (cell cycle arrest)。当这些事件造成的影响消失后, 细胞可再次进入细胞周期。DNA 损伤正是这样一个经常发生的事件。

DNA 损伤造成的细胞反应有两种: 一是损伤严重而修复无望, 细胞遂走向程序性死亡, 这样损伤就不至于造成突变; 二是当损伤有望修复时, 细胞通过一系列调节机制抑制细胞周期的进行, 抑制

* 国家自然科学基金 (39670235、39770409、39770238) 和 863 计划生物领域青年基金资助课题。

¹⁾ 通讯联系人。

²⁾ 北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083。

收稿日期: 1998-06-22, 修回日期: 1998-10-07